



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
Los sideróforos en el diseño de
fármacos y profármacos

Autor: Carlota Arévalo Escovar

Fecha: Julio, 2020

Tutor: Prof. Dr. Mónica María Söllhuber Kretzer

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	5
MATERIAL Y MÉTODOS	5
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
I. ESTRATEGIA DEL CABALLO DE TROYA	5
<input type="checkbox"/> <i>Sideromicinas</i>	7
- Albomicina	7
- Salmicina	8
<input type="checkbox"/> <i>Análogos sintéticos</i>	9
- Estructura de los análogos sintéticos	9
- Algunos ejemplos	10
II. INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE SIDERÓFOROS	13
III. INANICIÓN DEL HIERRO POR VÍA COMPETITIVA	14
IV. OTRAS APLICACIONES DE LOS SIDERÓFOROS	14
<input type="checkbox"/> Actividad antipalúdica y antituberculosa de los sideróforos	15
<input type="checkbox"/> Sideróforos en la terapia contra el cáncer	15
<input type="checkbox"/> Sideróforos en el desarrollo de vacunas.....	16
CONCLUSIÓN	17
BIBLIOGRAFÍA	18

RESUMEN

El desarrollo de resistencia a los antibióticos es hoy en día, un problema sanitario a nivel mundial. Entre las muchas opciones que pueden barajarse acerca de nuevas estrategias de diseño de antibióticos se encuentra el aprovechamiento de los sideróforos bacterianos, lo que permite reorientar la aplicación de muchos antibióticos cuyo uso se ha visto limitado. Estos sideróforos son estructuras quelantes de hierro, biosintetizadas por los microorganismos y que facilitan la asimilación de este metal para su supervivencia. El hierro participa en muchas reacciones enzimáticas vitales. La unión de fármacos a sideróforos que actuarían de grupos transportadores es un planteamiento revolucionario que permite nuevas alternativas terapéuticas, ya que, aprovechándose de los mecanismos de transporte de estos sideróforos, los fármacos van a alcanzar mejor su diana evitando resistencias. Ello se conoce como estrategia del “caballo de Troya”. Por otra parte, los conjugados de sideróforos podrían ser relevantes en enfermedades caracterizadas por una sobrecarga de hierro, como son el cáncer o la malaria.

- **Palabras clave:** resistencia, antibióticos, sideróforos, hierro, conjugados

ABSTRACT

Nowadays, antibiotic resistance is a global health problem. Among the many options that can be considered as a new strategy for designing improved antibiotics we can find the use of bacterial siderophores, which allow refocusing antibiotics whose therapeutic application, has been limited by the presence of permeability barriers among others. These siderophores are iron chelating structures that allow iron assimilation for microorganism survival. Iron participates in many vital enzymatic reactions. The binding of drugs to siderophores is a revolutionary approach that grants antibiotics to reach their target by taking advantage of siderophore transport mechanisms avoiding resistance. This is called “Trojan horse strategy” because with the uptake of the siderophore-antibiotic conjugate ends the life of the bacteria. Furthermore, the conjugated siderophores could be relevant in diseases characterized by iron overload, such as cancer or malaria.

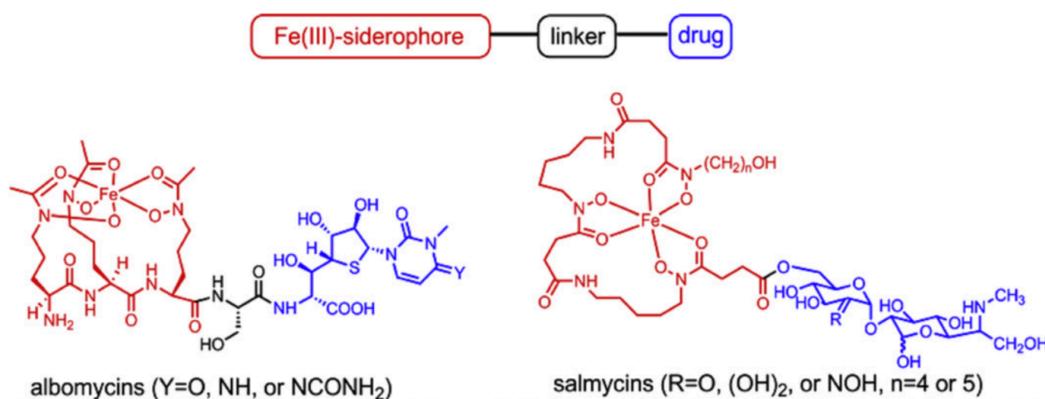
- **Key words:** resistance, antibiotics, siderophores, sideromycins, Trojan horse strategy

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es una de las principales amenazas que afectan a la salud humana y a la sociedad a nivel mundial. (1) El desarrollo de resistencias por parte de las bacterias, se debe principalmente al incremento de infecciones producidas por los conocidos MDR, patógenos multi-fármaco resistentes (del inglés ‘multi-drug resistance’) (2), entre los cuales destacan *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (3). Otras de las causas son: el uso excesivo de antibióticos, que ha hecho que se produzcan alteraciones a nivel microbiano, como, por ejemplo, variaciones en la permeabilidad de sus membranas, incremento de mecanismos de eflujo y cambios en el sitio de unión de los fármacos. (4) Por último mencionar el desarrollo de numerosos mecanismos de defensa por parte de algunas bacterias como es la sobreexpresión de algunas enzimas del tipo β - lactamasa.(5)

Debido a la progresiva aparición de estas resistencias, nace la necesidad de buscar alternativas terapéuticas y, por tanto, nuevas estrategias sintéticas. Más allá del descubrimiento de fármacos por serendipia como ocurrió con la penicilina, se busca el poder imitar las estrategias antibacterianas naturales (3) así como el estudio de fármacos multi-diana (‘multi-target’), que son capaces de actuar empleando distintos mecanismos sobre diferentes dianas y por tanto se va a reducir la complejidad de los tratamientos, aumentando la eficacia y disminuyendo el número de ensayos clínicos para su puesta en circulación, lo que supone una ventaja económica.

Una de las posibilidades que nos ofrece esta modalidad, es la optimización estructural de los fármacos mediante ‘linked-pharmacophores’, que implica la unión de dos agentes potentes, como ocurre en el caso de las **sideromicinas**, que son el resultado de la unión de un sideróforo, un espaciador y un antibiótico producidas de manera natural. (6) [Fig. 1]



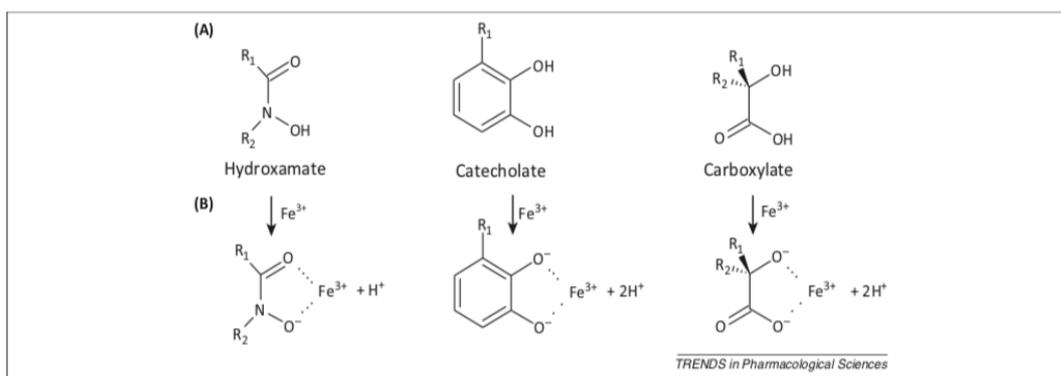
[Fig.1] Estructura general de un conjugado fármaco – sideróforo y las dos sideromicinas naturales más notables. (23)

El **hierro** es un metal de transición que posee dos estados de oxidación, Fe (III) (ion férrico) y Fe (II) (ion ferroso), y es esencial para los seres vivos porque interviene en numerosos procesos biológicos. (1) (7) Este elemento es indispensable para la supervivencia y multiplicación de la mayoría de los microorganismos y hongos, porque actúa como cofactor de numerosas reacciones enzimáticas, interviene en el metabolismo del oxígeno, en la síntesis de DNA y en procesos de detoxificación de radicales libres. (8) En condiciones aerobias y a pH neutro, el hierro suele encontrarse en su forma oxidada (III), siendo insoluble y formando parte de sales

e hidróxidos lo cual dificulta su adquisición por parte de las bacterias, y esto supone un fracaso en el proceso de invasión al huésped. Para superar esta situación, las bacterias van a sintetizar y secretar sideróforos. (9)

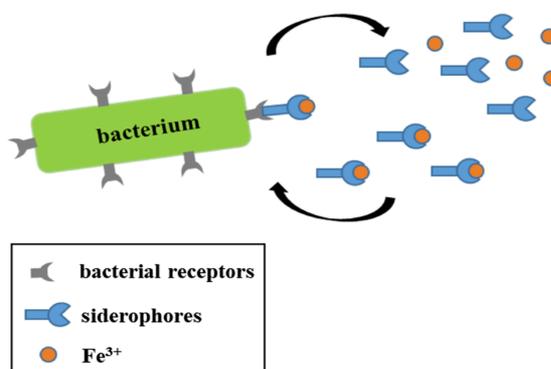
Los **sideróforos**, del griego, ‘portadores de hierro’ son compuestos de bajo peso molecular (0.5 a 1.0 kDa) (8), secretados por microorganismos, plantas y hongos en condiciones limitantes, que poseen una gran afinidad y selectividad por el hierro. (10) Existen más de 500 tipos y en su estructura poseen átomos de oxígeno y/o nitrógeno (donadores de electrones) los cuales se van a poder coordinar fundamentalmente con el hierro, aunque también podrían hacerlo con otros metales pesados como son el zinc o el galio. (11)

En función de la naturaleza del donador de electrones, podremos distinguir entre tres tipos fundamentalmente: hidroxamatos, catecoles y carboxilatos. También podemos encontrar sideróforos mixtos que incluyen esqueletos cíclicos y estructuras hexadentadas que poseen una alta estabilidad termodinámica. (5) Por lo general, las bacterias producen sideróforos con estructura de catecol mientras que los sideróforos fúngicos tienen estructura de hidroxamato. (12) [Fig. 2]



[Fig.2] Principales grupos funcionales de sideróforos. (18)

En condiciones de escasez de hierro, las bacterias gracias a una sideróforo - sintasa van a ser capaces de sintetizar sideróforos y excretarlos al medio extracelular. (10) Una vez en el medio extracelular, se van a coordinar con el Fe (III) dando lugar a la formación de un complejo Fe (III) - sideróforo (ferrosideróforo) que es reconocido por proteínas de membrana específicas, dependientes de un sistema de energía TonB siendo de esta manera transportado activamente al interior. [Fig.3] (1) (7) Una vez alcanzado el citoplasma, se produce la reducción a Fe (II) y su liberación.



[Fig.3] Mecanismo de adquisición de hierro por parte de las bacterias. (1)

Debido a la importancia de este proceso, la **adquisición de hierro** es un objetivo potencial para el desarrollo de nuevos fármacos y profármacos, lo que implica la aparición de nuevos tratamientos. (13) Una de las estrategias más destacada, es la del Caballo de Troya, que consiste en la conjugación de un antibiótico y un sideróforo de tal manera que el antibiótico aprovecha el mecanismo de transporte del sideróforo para alcanzar su diana y actuar, sobre todo a la hora de atravesar la membrana extracelular en el caso de las bacterias Gram-negativas. (14)

OBJETIVOS

En este trabajo se profundizará en el estudio de los sideróforos como nuevo recurso para el desarrollo de nuevos antibióticos y profármacos de antibióticos que, de esta forma, ampliarán su espectro de acción incluyendo entre otras, las infecciones sobre las que han aparecido resistencias. Haremos referencia a los compuestos naturales producidos por los microorganismos y a sus miméticos sintéticos que se encuentran en investigación.

Se estudiarán los sideróforos como nueva herramienta farmacológica, siguiendo distintas estrategias, por medio de:

- El análisis de los compuestos naturales producidos por las bacterias: sideromicinas.
- La revisión de ejemplos de antibióticos potenciales (profármacos) que se benefician del sideróforo y su mecanismo de liberación en la célula.

MATERIAL Y MÉTODOS

Al tratarse de una revisión bibliográfica sobre los sideróforos en el diseño de fármacos y profármacos se han utilizado principalmente bases de datos científicas como son Pub Med, y Science Direct perteneciente al grupo Elsevier, entre otras.

Para llevar a cabo la búsqueda se han usado palabras clave como “siderophores”, “sideromicins”, “cefiderocol”, “resistencia antibióticos” y “Trojan Horse strategy”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

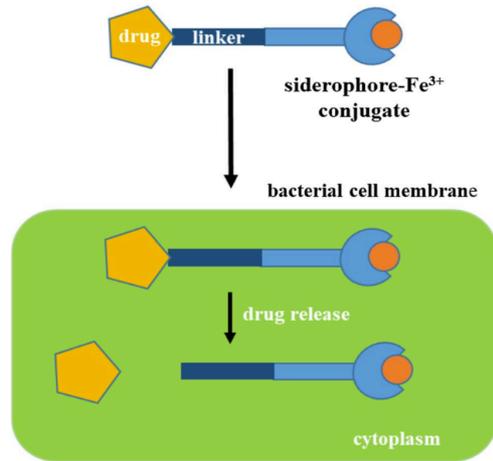
La biosíntesis de sideróforos como herramienta para la captación de hierro en las bacterias es un factor de virulencia fundamental para que pueda darse el proceso infeccioso. (7) Por este motivo actuar sobre ellos, resultaría una estrategia clave para superar ciertas enfermedades. Existen distintos procedimientos relacionados con la adquisición de hierro sobre los que podemos trabajar para impedir la supervivencia del patógeno como son: la estrategia del Caballo de Troya, la inhibición de la biosíntesis de sideróforos y la inanición del hierro por vía competitiva. (1)

I. ESTRATEGIA DEL CABALLO DE TROYA

El concepto del caballo de Troya implica la conjugación de un sideróforo que va a captar hierro, esencial para las bacterias, y un fármaco que va a matarlas. Esta estrategia permite superar las resistencias a medicamentos debidas a la permeabilidad de las membranas bacterianas. El complejo fármaco - sideróforo va a ser reconocido por receptores específicos de sideróforos y posteriormente transportado al interior. (11) [Fig. 4]

Por tanto, estos compuestos conjugados, están formados por un sideróforo, una molécula de hierro, un grupo espaciador y un fármaco. Todos los componentes tienen una función esencial y son imprescindibles, ya que en ocasiones algunos fármacos no serían capaces de atravesar la membrana bacteriana por sí solos, y se van a aprovechar del **transporte de hierro**. (1)

Las bacterias, tienen unas proteínas receptoras específicas en la membrana externa (OMR), dependientes de un sistema de energía Ton - B que permite la introducción del fármaco una vez que se ha producido el reconocimiento. El hecho de atravesar la membrana celular es diferente entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, ya que estas últimas contienen una bicapa lipídica adicional, la membrana externa.

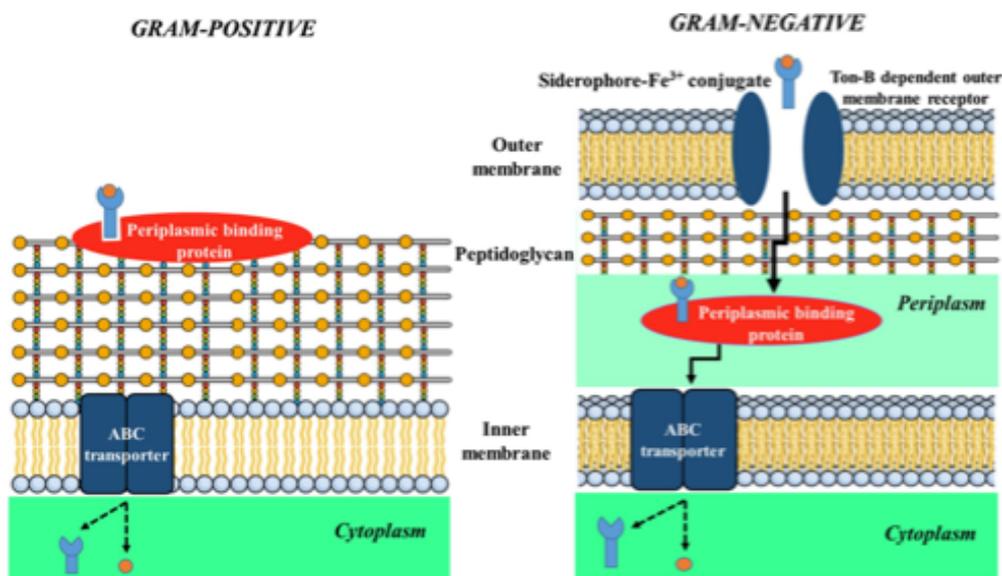


[Fig. 4] Estrategia del Caballo de Troya. (1)

En bacterias Gram-negativas, la membrana externa protege a la bacteria, comportándose como una barrera frente a algunos antibióticos y detergentes. (1) El conjugado fármaco-sideróforo tras ser reconocido por receptores específicos de membrana, como son FepA (enterobactina), FhuA (ferricromo), FecA (dicitrato férrico) en *E. coli* y FpvA (pioverdinas), FptA (piochelina) en *P. aeruginosa* atravesará este espacio gracias a un sistema dependiente de energía, llegando a la zona periplásmica.

Una vez en el espacio periplásmico se unirá a una proteína de unión (PBP) y por medio de un transportador de tipo ABC dependiente de ATP, será conducido activamente al interior celular donde se producirá la liberación del hierro y del fármaco transportado.

En bacterias Gram-positivas tan solo se da la unión a PBP y su transporte hacia el citoplasma gracias a la energía proporcionada por el ATP. [Fig. 5]



[Fig. 5] Sistema de transporte en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. (1)

Los sideróforos, poseen un bajo peso molecular y un carácter hidrófilo, lo cual facilita su difusión a través de las membranas celulares y por ello podrían ser utilizados como vehículo en el **diagnóstico médico**, superando las limitaciones de la tomografía. El uso de sideróforos radio-marcados nos permite obtener imágenes específicas de las infecciones causadas por patógenos, ya que sabemos que los mamíferos no utilizan este sistema para la captación de hierro. (3)

- **Sideromicinas**

De manera natural, algunas bacterias son capaces de producir compuestos que resultan ser una especie de fármaco dual, formado por la unión covalente de un sideróforo y un antibiótico, llamados sideromicinas. Dentro de las sideromicinas se incluyen la albomicina y la salmicina entre otras, siendo esta dos las más estudiadas y de las que hablaremos a continuación.

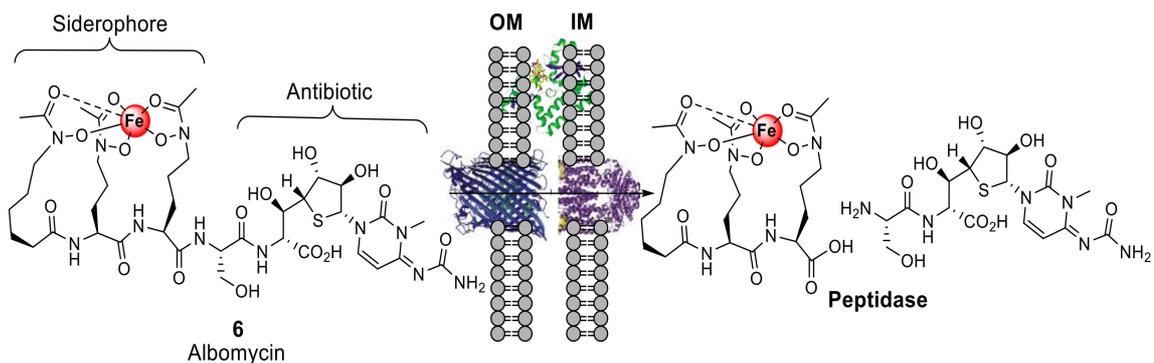
- **Albomicina**

La albomicina fue descubierta en 1951 y mostró ser eficaz en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas. Hoy en día se trabaja para que sus análogos sintéticos formen parte de la nueva generación antibiótica. (15)

Es producida por el género *Streptomyces* y contiene una fracción de tiorribosil citosina unida, a través de un residuo de serina, a un péptido tris(N-acetil, N-hidroxiornitina), que es un sideróforo hidroxamato. La porción del nucleósido de serinilo, la fracción 4'-tio (N4-carbamoyl-3-metil) citidina unida al resto serina, actúa como antibiótico, ya que es un potente inhibidor de la serinil-tRNA sintetasa, una aminoacil - tRNA sintetasa (aaRS), enzima que interviene en la síntesis de proteínas. (16) (17) Debido a su estructura, la albomicina está incluida dentro de los fármacos que actúan según la estrategia del Caballo de Troya.

Esta sideromicina, ha resultado ser muy eficaz frente a muchas bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *S. pneumoniae* y también frente a algunas Gram-positivas como *S. aureus*.

Se estudió el mecanismo de acción de la albomicina en *E. coli*, frente a la que presenta una gran actividad. En el estudio se comparó simultáneamente el transporte de la albomicina y del ferro-cromo y se vio que ambos sistemas estaban codificados por cuatro genes principales; *fhuA* (codifica una proteína de transporte de membrana externa), *fhuB* (codifica una proteína de transporte de membrana citoplasmática), *fhuC* (codifica una ATPasa) y *fhuD* (codifica una proteína de unión periplasmática) y otros tres adicionales, siendo el más notable *TonB* que proporciona energía al sistema de transporte. (3) [Fig. 6]



[Fig. 6] Diagrama esquemático del proceso de internalización de la albomicina. (5)

La parte peptídica de la albomicina es estructuralmente similar a un sideróforo fúngico y va a ser reconocida por el receptor FhuA y por la proteína de unión FhuD.

Una vez alcanzado el interior celular, se produce la escisión entre el antibiótico y sideróforo por acción de la peptidasa N (pep N). La fracción de tiorribosil citosina va a ser hidrolizada enzimáticamente por actividad de la proteasa de serina, y actuará inhibiendo la aminoacil tRNA sintetasa, bloqueando de esta forma la síntesis proteica. En el caso de que se diera una mutación de la peptidasa N, no se produciría esta hidrólisis y el antibiótico sería expulsado unido al sideróforo una vez liberado el hierro. (18)(19)

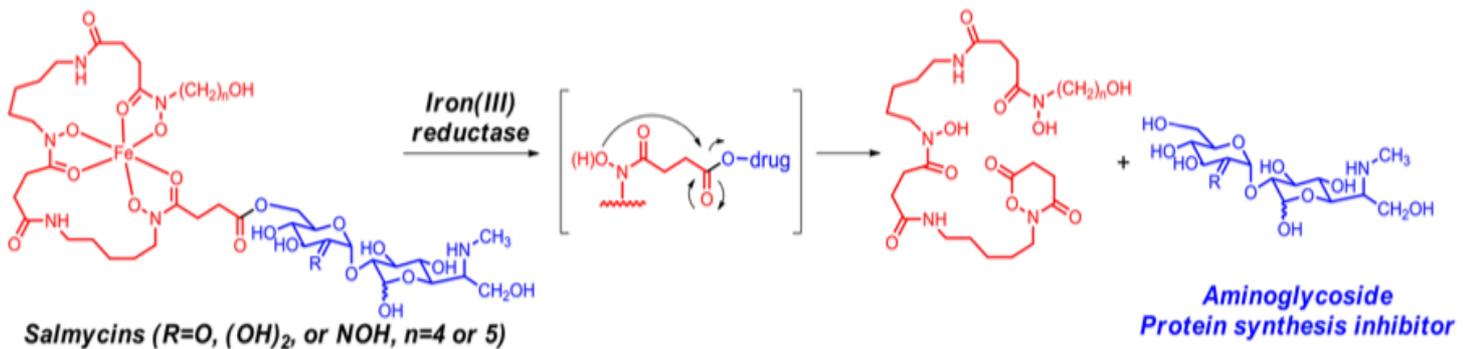
Como ya se ha comentado, el hecho de atravesar la membrana resulta difícil para muchos antibióticos, especialmente en las bacterias Gram-negativas y la concentración mínima inhibitoria (CMI) necesaria para la acción antibiótica puede llegar a alcanzar niveles tóxicos para poder ser eficaz. En el caso de la albomicina, al aprovecharse el transporte del Fe (III) para ser introducida al interior de la bacteria, la CMI (5 ng/ml) necesaria para ejercer su acción antibiótica es mucho menor que cuando se administra solo ampicilina (100 ng/ml), por ejemplo. (20)

- Salmicina

La salmicina es otra sideromicina producida por el género *Streptomyces* y parece ser eficaz exclusivamente frente a bacterias Gram-positivas. (6) En su estructura contiene un sideróforo de ferroxamina B (danoxamina) unido a un aminoglucósido, capaz de inhibir la síntesis de proteínas.

Se ha estudiado el comportamiento de la salmicina y albomicina en bacterias Gram-positivas como *S. aureus* y *S. pneumoniae* y se llegó a la conclusión que ambas sideromicinas usan el mismo sistema de transporte (explicado anteriormente) pero a diferencia de la albomicina, no se sabe si la salmicina llega también al citoplasma. (9)

A pesar de no conocerse el destino final de la salmicina en el interior de la bacteria, se ha visto que tras la liberación del hierro (sideromicina desferrizada), puede darse una ciclación intramolecular y la consiguiente liberación del aminoglucósido. (3) [Fig. 7]



[Fig. 7] Mecanismo de escisión de la Salmicina. (27)

- **Análogos sintéticos**

Por su parte, en la búsqueda de nuevos fármacos y profármacos que nos ayuden superar los mecanismos de resistencia bacteriana se encuentran análogos sintéticos.

La conjugación sintética o semi-sintética de un antibiótico y un sideróforo, mimetizando el papel de las sideromicinas, permite la administración de fármacos independientemente de cual sea su peso molecular, polaridad o carga, ya que se van a aprovechar de los sideróforos que se comportan como un vector o transportador. (4)

Gracias a estos conjugados, los antibióticos que solo eran activos en bacterias Gram-positivas porque tenían dificultad para atravesar la membrana externa, ahora también pueden servirnos para las bacterias Gram-negativas ya que el fármaco va a pasar ‘camuflado’ al interior por el sistema de transporte de los sideróforos. (21)

- **Estructura de los análogos sintéticos**

En el caso de los análogos sintéticos, el **sideróforo** suele tener estructura de catecol o hidroxamato, aunque también puede ser un citrato. Los sideróforos de citrato son menos destacables y se van a conjugar mediante un enlace amídico químicamente estable presentando una actividad moderada. También existen conjugados que cuentan con la presencia de un catecol y un hidroxamato y son conocidos como sideróforos mixtos. (22) El esqueleto del sideróforo facilita el reconocimiento por parte de las proteínas específicas que poseen los patógenos aumentando de esta forma su selectividad y reduciendo la CMI del antibiótico.

Dentro del diseño de estos compuestos, se debe tener en cuenta la naturaleza del grupo **espaciador**, responsable de la unión entre el sideróforo y el fármaco y de su posterior escisión. Los grupos funcionales más habituales que suelen usarse como grupos enlazantes destacamos: aminoácidos, cadenas de alquilo, cadenas de polietilenglicol (PEG), tiazoles, acetales, enlaces de disulfuro, ésteres e incluso antibióticos β -lactámicos, entre otros. Estos ligandos se van a clasificar en función de su capacidad de escisión espontánea por hidrólisis, por reducción o por acción enzimática. Aquellos profármacos que incluyan un espaciador capaz de escindirse espontáneamente, serán más parecidos a las sideromicinas naturales, pero su síntesis resultará más difícil, ya que en el caso de que hubiera una variación de pH o presencia de esterases, podría darse la separación sin haber alcanzado la diana donde debe actuar el fármaco, por ello se deben tener en cuenta todos los factores fisicoquímicos que puedan intervenir durante el trayecto farmacocinético e intentar encontrar el ‘equilibrio’ para que la división se produzca en el momento adecuado. Por otra parte, se pueden utilizar también espaciadores que escindan en el sitio de acción como sucede con el empleo un antibiótico β -lactámico como grupo espaciador (en vez de como antibacteriano). Se comprobó que tenían CMI mejoradas pues tan solo se activarán en presencia de β -lactamasas, que se encuentran en la diana o sitio de acción.

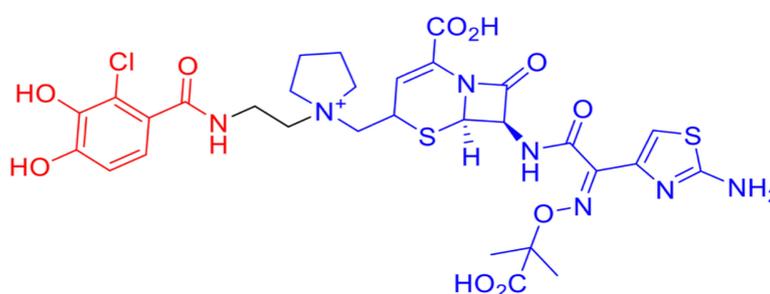
En lo que respecta al **antibiótico**, los más estudiados de momento son los antibióticos β -lactámicos como cefalosporinas, los inhibidores de la DNA girasa como el ciprofloxacino y las oxazolidinonas como la linezolidina. Gracias a la conjugación con el sideróforo estos fármacos aumentan su potencia y son más eficaces frente a las bacterias multirresistentes (MDR). También se han estudiado otros antibióticos como la vancomicina o eritromicina, pero hasta la fecha no se han obtenido resultados significativos. Que los conjugados logren ser más efectivos que el antibiótico original depende de muchos factores entre los que destacan la especie

bacteriana, la disponibilidad de hierro y las características del antibiótico. Por ejemplo, en un estudio de eficacia sobre la conjugación con eritromicina, se concluyó que esta era nula, debido a su gran tamaño, sin embargo, la daptomicina, a pesar de sus dimensiones, es capaz de atravesar las membranas gracias a la unión al sideróforo. (5)

- Algunos ejemplos

A continuación, se muestran los profármacos más notables que se han descubierto hasta el momento:

Entre los ejemplos que se estudian en este trabajo, destaca el **CEFIDEROCOL**, que es una cefalosporina siderofórica inyectable descubierta y desarrollada en Japón, que se ha incorporado al arsenal terapéutico de la UE en febrero de 2020 para el tratamiento de infecciones del tracto urinario. Ha mostrado ser muy potente frente a patógenos Gram-negativos MDR incluida la *Pseudomonas aeruginosa*. (6)



[Fig. 8] Estructura del Cefiderocol. (5)

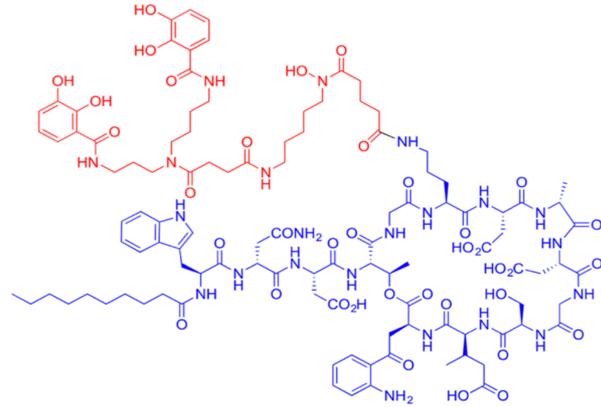
Su potencia se debe a que contiene un análogo de cefalosporina, similar a la ceftazidima y a la cefepima (cefalosporinas de tercera y cuarta generación) unido a un grupo mono-catecol simplificado capaz de quelar el hierro (sideróforo), por medio de un espaciador no escindible. Gracias a este sideróforo es reconocido por los sistemas de transporte de las bacterias Gram-negativas y transportado al espacio periplásmico. (5) [Fig. 8]

Al tratarse de una conjugación con un antibiótico β -lactámico, su actividad principal va a ser la inhibición de la pared celular bacteriana la unirse a las PBP (penicillin binding proteins). Gracias al sideróforo, además de ser capaz de pasar al espacio periplásmico, va a tener mayor estabilidad frente a las β -lactamasas. Se ha comprobado que este compuesto funciona de manera similar o superior a sus agentes de referencia, incluyendo la ceftazidima y la cefepima.

Los carbapenemos, hasta hace relativamente poco, resultaban ser el último recurso frente a infecciones MDR, ya que no se habían desarrollado mecanismos de resistencia que les afectarían. (12) Se sabe que el cefiderocol es capaz de hacer frente a infecciones causadas por bacilos resistentes al carbapenemo y por bacterias MDR Gram-negativas, como son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacteriaceae*. (23)(28)

Otro profármaco destacable es la **SIDEROMICINA DE DAPTOMICINA** [Fig. 9].

La daptomicina es un antibiótico polianiónico de gran tamaño, lo que dificulta su difusión a través de las membranas, siendo activo solo frente a bacterias Gram-positivas. (24) Su unión a un sideróforo análogo a la fimsbactina (sideróforo natural de *A. Baumannii*) da lugar a un profármaco activo frente a cepas patógenas de bacterias Gram-negativas como de *A. baumannii*. En cambio, ensayos realizados con conjugados de bis-/tricateoles como sideróforos resultaron ser menos efectivos que los conjugados que poseían ligandos mixtos. Esto

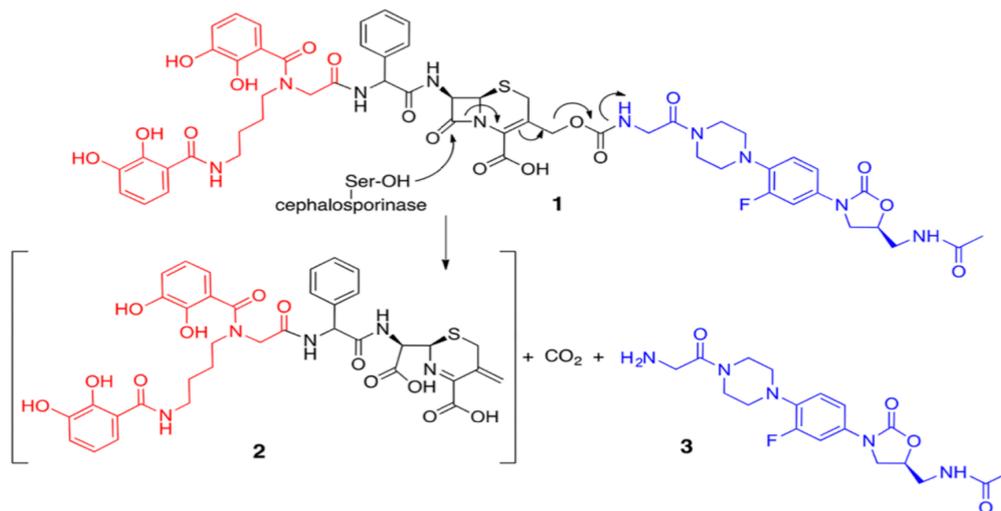


[Fig.9] Conjugado de Daptomicina. (12)

demuestra que es importante que el sideróforo transportador mimetice a los sideróforos naturales producidos por las bacterias a combatir para que aumenten las probabilidades de éxito en el diseño de estas sideromicinas. Con este ejemplo, se demuestra además que un antibiótico Gram-positivo frente al cual se han podido desarrollar resistencias se puede transformar en un antibiótico de amplio espectro activo frente a bacterias Gram-negativas. (25)

En el ejemplo de **SIDEROMICINAS DE OXAZOLIDINONAS**, se observa la unión de un análogo de la oxazolidinona eperezolida con una cefalosporina que actúa como espaciador y un sideróforo. Las oxazolidinonas son antibióticos activos frente a bacterias Gram-positivas y que actúan en los ribosomas, inhibiendo la síntesis de proteínas. Gracias a la conjugación con el sideróforo, que va a actuar como transportador del fármaco al espacio periplásmico y a la presencia de una cefalosporina como grupo espaciador escindible por β -lactamasas, la oxazolidinona va a ser eficaz frente a bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas.

En el espacio periplásmico este profármaco va a ser activado por acción de las β -lactamasas bacterianas.

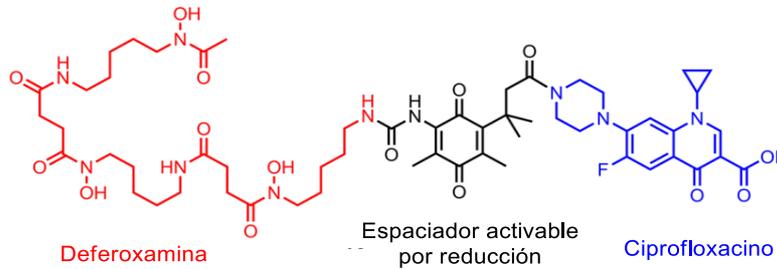


[Fig. 10] 1- Estructura del conjugado de un análogo de eperezolida y su bioactivación por β - lactamasa
2- Escisión del espaciador y liberación del antibiótico (25)

Tal y como se muestra en la figura 10, estas enzimas contienen en su centro activo un resto de serina que por ataque nucleofílico al carbonilo del anillo β-lactámico inicia la hidrólisis y degradación química espontánea de la cefalosporina con liberación del antibiótico que va a interferir en la síntesis proteica. (24)

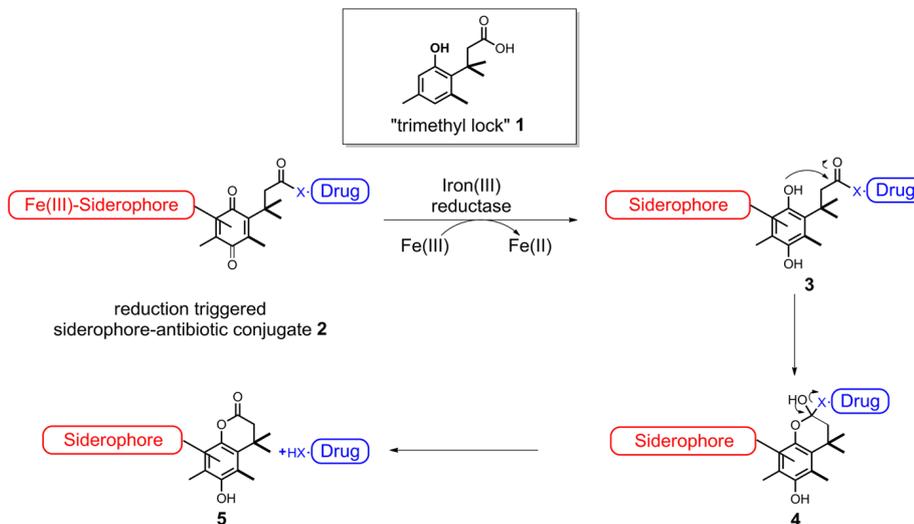
Se sintetizaron también análogos de la **linezolidina**, uno de los antibióticos más nuevos en el mercado, unido a un catecol con el fin de reducir la CMI de este antibiótico contra bacterias Gram-positivas. (5)

En el ejemplo de las **SIDEROMICINAS DE FLUOROQUINOLONAS** el grupo espaciador tiene la peculiaridad de ser activado por medio de la reducción metabólica del Fe (III), lo que implica que la bioactivación y liberación del antibiótico tiene que producirse necesariamente en el citoplasma, es decir en el interior de la bacteria. El ciprofloxacino (fluoroquinolona) está conjugado con un sideróforo mixto, un trihidroxamato como la deferoxamina B que puede ser reconocido por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas e incluso por algunos hongos. El ciprofloxacino es un antibiótico de amplio espectro, que actúa contra las topoisomerasas y DNA girasas necesarias para el crecimiento y división celular. [Fig. 11]



[Fig. 11] Conjugado de deferoxamina con el antibiótico ciprofloxacino y espaciador activable por reducción. (12)

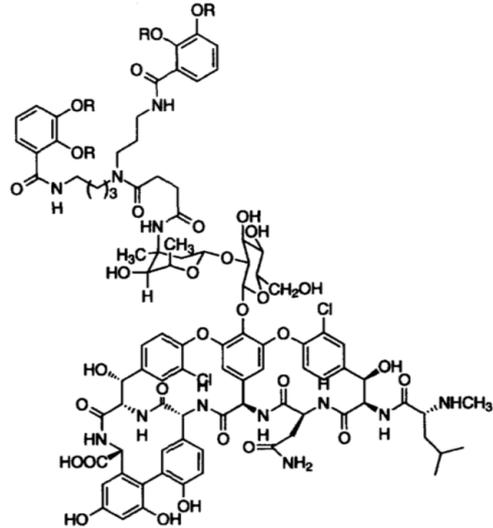
La bioactivación intracelular de la sideromicina del ciprofloxacino se inicia con la reducción de la quinona a hidroquinona por reductasas bacterianas. La hidroquinona formada sufre una ciclación espontánea a lactona que está favorecida por las interacciones estéricas desfavorables que se producen entre los tres grupos metilo cercanos al anillo. En este proceso se produce la liberación del fármaco como se indica en la figura 12 (22).



[Fig.12] Mecanismo de liberación de profármacos de tipo fluoroquinolona (12)

En el caso de la conjugación por acilación selectiva de la **vancomicina**, un antibiótico glicopéptido usado frente a bacterias Gram-positivas, se unió este antibiótico a un sideróforo de tipo catecol y a uno mixto de tipo hidroxamato - catecol.

La vancomicina, está formada por un heptapéptido central, siete aminoácidos de los cuales cinco son aromáticos y dos alifáticos, y un grupo fenólico unido a dos disacáridos. Los residuos de azúcar mostraron ser importantes para la dimerización fisiológica de este compuesto, así como el resto de N-metilleucina que es imprescindible para su unión a la pared bacteriana. Se observó que algunos antibióticos glicopéptidos con residuos acil-alifáticos tenían una actividad mejorada. Por tanto, teniendo en cuenta estas premisas en la síntesis de este profármaco se buscó la acilación selectiva del grupo amido primario de la vancomicina.



[Fig. 13] Análogo sintético de la Vancomicina (23)

En bacterias Gram-positivas, este tipo de vancomicinas ‘aciladas’ no mostraron ser tan eficaces como la vancomicina original, sin embargo, en situaciones limitantes de hierro, el conjugado que se muestra en la figura 13 resultó ser activo en *P. aeruginosa*, presentando valores de CMI reducidos en comparación con la administración del antibiótico solo. (5)(23)

La **5-fluorocitosina**, (5 - FC) es un potente antifúngico, que incluye un sideróforo trihidroxamato que mimetiza a la norneoactina y a la eritromicina siendo activa frente a especies pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Además, los autores de este estudio conjugaron múltiples metabolitos, obteniendo un multi 5-FC que tiene una mayor potencia.

II. INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE SIDERÓFOROS

La biosíntesis de sideróforos es un proceso vital para el desarrollo y supervivencia bacteriana, por esto su inhibición podría ser una nueva diana farmacológica frente a las enfermedades infecciosas, ya que en condiciones limitantes de hierro la bacteria morirá.

En 2008 fueron patentados varios compuestos antibacterianos con capacidad para bloquear la esta biosíntesis en las bacterias. Su mecanismo de acción se basa en sales que inhiben los dominios de adenilación y/o tiolación del péptido no ribosomal, que en bacterias y algunos hongos es el encargado de la síntesis de metabolitos secundarios, en este caso los sideróforos.

Se estudió la ruta metabólica por la cual se producían los sideróforos y sus posibles modificaciones con la finalidad de poder sintetizar compuestos inhibidores. (3)

En *P. aeruginosa* se vio que el factor PvdS, era el responsable de la expresión de genes de la pioverdina (sideróforo natural secretado por esta especie) cuando los niveles de hierro son bajos y que también promueve la expresión de factores de virulencia como la exotoxina A. En este

estudio se comprobó que la fluorocitosina, era capaz de inhibir la expresión de estos genes, así como desencadenar la regulación de los factores de virulencia.

En lo que respecta a *S. aureus* se sabe que sintetiza sideróforos que incluyen una base de citrato destacando la estafiloferrina A y la estafiloferrina B. Esta última parece presentar una función importante para la supervivencia y su inactividad mostró reducir la virulencia en un modelo de infección con *S. aureus* sobre un ratón.

Por su parte, la baulamicina A y la baulamicina B son dos sideróforos extraídos del género *Streptomyces* y han sido capaces de inhibir esta biosíntesis tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. (1)

III. INANICIÓN DEL HIERRO POR VÍA COMPETITIVA

En el caso de que las bacterias desarrollaran mutaciones en sus receptores impidiendo el reconocimiento de los sideróforos y dificultando así la adquisición de hierro, también se verían afectadas por la falta de este, siendo más propensas a la inanición del hierro, lo que acabaría asimismo con sus vidas. (12)(17)

Una de las defensas naturales del huésped contra los patógenos consiste en mantener lo más bajas posible las concentraciones de hierro disponibles por medio de proteínas quelantes de hierro, siendo esta vía una nueva diana farmacológica.

Muchas enfermedades producidas por bacterias, como la fibrosis quística, se complican por la formación de biofilms que son resistentes a los antibióticos. Estos biofilms necesitan hierro para su formación y por ello resulta interesante el desarrollo de quelantes de hierro no metabolizables.

La lactoferrina es una de las proteínas quelantes naturales y se encuentra presente en las secreciones respiratorias siendo capaz de inhibir la formación de biofilms de *P. aeruginosa*. Se hicieron estudios con la conalbúmina y EDTA, en los cuales se vio que el EDTA es capaz, no solo de quelar hierro, sino que también interfiere en la asimilación de calcio y magnesio siendo más potente su acción que la de la gentamicina.

Aunque esta nueva ‘vía antibacteriana’ se encuentra en desarrollo se ha visto que la combinación de la tobramicina con una deferoxamina o con el deferasirox, dos quelantes de hierro aprobados por la FDA, reduce la estabilidad de la biomasa de los biofilm y previene la formación de estos en las células de las vías respiratorias por *P. aeruginosa*. (1)(3)

IV. OTRAS APLICACIONES DE LOS SIDERÓFOROS

Además del notable papel que desempeñan los sideróforos en las infecciones bacterianas y su posible aplicación para la mejora de antibióticos, también pueden estar implicados en el tratamiento de enfermedades como la malaria, en la terapia contra el cáncer o en el desarrollo de nuevas vacunas. (1)

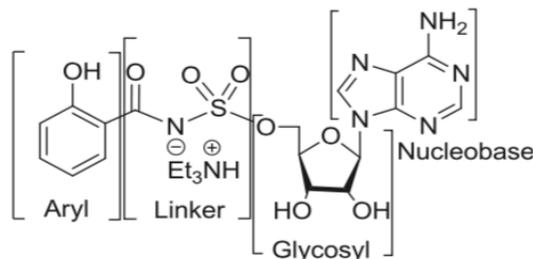
- **Actividad antipalúdica y antituberculosa de los sideróforos**

Los sideróforos de *Mycobacterium tuberculosis*, son la micobactina y la carboximicobactina, estructuralmente similares (formados por péptidos - poliacéticos no ribosómicos), de tipo mixto e hidroxamato. Por su parte la micobactina es un sideróforo lipófilo e intracelular mientras que el segundo es extracelular.

Debido a la selectividad ya comentada de estos compuestos, se llevó a cabo la síntesis química de derivados de la micobactina, que mostró ser un factor de virulencia en infecciones tuberculosas.

Se conjugó el antipalúdico artemisina con un análogo del sideróforo de micobactina T y se formuló la hipótesis de que la reducción del Fe (III) a Fe (II) inducía a la producción de radicales libres del oxígeno que mostraban acción antimicrobiana, por tanto, el sideróforo no servía solo como transportador sino también como agente antibiótico.

Pero sin duda, la aplicación más importante de los sideróforos producidos por micobacterias es la inhibición de la biosíntesis de estos. Se comprobó que el Sal-AMS 7 [Fig. 14] es capaz de bloquear la acción de las AAAE (aryl acid adenylation enzymes) porque imita la acilación reemplazando el grupo acilfosfato por un grupo acilsulfamato. Este acilsulfamato es un grupo estable y no se va a acilar frenando así la síntesis. Estudios de relación estructura - actividad (SAR) permitieron elucidar el grupo farmacóforo del Sal-AMS 7 para desarrollar nuevos fármacos. El Sal-AMS 7 mostró una alta biodisponibilidad oral y debido a sus propiedades fisicoquímicas baja tasa de eliminación. (1) (10)



[Fig. 14] Estructura del Sal-AMS 7 (10)

- **Sideróforos en la terapia contra el cáncer**

El hierro está implicado en el desarrollo del cáncer. La proliferación de células cancerosas requiere una concentración mayor de este metal de transición para su crecimiento, lo que da lugar a un desequilibrio de la homeostasis de este. Esta alteración resulta importante para la progresión del tumor, por esto muchos pacientes con cáncer, suelen presentar anemia crónica.

La transferrina (metaloproteína) y su sistema de transporte del hierro representa una de las principales vías para adquirir hierro en los seres humanos. Se vio que los sideróforos poseen una mayor afinidad por el hierro que esta, por tanto, podrían usarse en la terapia antitumoral, tanto como transportadores de compuestos tóxicos como de antibióticos en el caso de presentarán una infección derivada.

La inanición del hierro por vía competitiva rompería la homeostasis, reduciendo la biodisponibilidad de este metal e inhibiendo la síntesis de DNA provocando la detención del ciclo celular y promoviendo la apoptosis de las células tumorales. Se vio que la tiosemicarbazona-24 era capaz de suprimir el crecimiento de tumores hepatocelulares en humanos según este mecanismo.

Las células inmunitarias del huésped segregan lipocalina, conocida como siderocalina, que en su estructura incluye aminoácidos cargados positivamente como arginina 81, lisina 125 y lisina 134 que son sensibles a la unión al hierro porque forman interacciones catiónicas no covalentes con las estructuras aromáticas donantes de electrones de los sideróforos, por tanto, va a ser capaz de fijar sideróforos. (10) (27)

- **Sideróforos en el desarrollo de vacunas**

Con el fin de prevenir el contagio y tratar infecciones multirresistentes se investigó el potencial de los sideróforos como antígenos. Los autores de este estudio conjugaron sideróforos con proteínas inmunogénicas que causaban una respuesta inmunitaria adaptativa, protegiendo sobre todo frente a infecciones del tracto urinario. (1)

CONCLUSIÓN

El desarrollo de nuevos fármacos y profármacos que se beneficien de la presencia de sideróforos supone un avance en la terapia antibiótica y en el desarrollo de nuevos tratamientos, ya que el éxito terapéutico está relacionado con la presencia y asimilación del hierro por parte de la mayoría de los microorganismos. Hasta la fecha, el aprovechamiento de los sideróforos se relaciona con tres estrategias, la del caballo de Troya, la inhibición de la síntesis de sideróforos, que dificulta la captación del hierro en condiciones normales limitando la supervivencia de muchos microorganismos, y la inanición del hierro por vía competitiva.

Se ha visto que algunas bacterias, igual que son capaces de producir antibióticos, también producen sideromicinas, siendo la albomicina la más estudiada y el punto de partida para el desarrollo de nuevos profármacos. Entre los resultados obtenidos está el primer antibiótico de muy amplio espectro resistente a β -lactamasas y portador de un grupo sideróforo, el cefiderocol, que ya tiene aplicación terapéutica en infecciones urinarias graves.

Para que la conjugación fármaco - sideróforo presente mejores características tanto intrínsecas como extrínsecas que el fármaco de referencia, es muy importante tener en cuenta el mecanismo de liberación del fármaco una vez alcanzada la diana. En este trabajo hemos hecho referencia a los profármacos en desarrollo más relevantes que aprovechan las condiciones de bioactivación selectiva. Así, por ejemplo, la presencia de β -lactamasas en el espacio periplásmico de las bacterias permite hidrolizar cefalosporinas que actúan como espaciadores favoreciendo la liberación del antibiótico de tipo quinazolona o oxazolidinona. Por otra parte, la bioactivación reductora de quinonas, que por medio de una lactonización se ve facilitada la escisión del conjugado antibiótico – sideróforo, permite la liberación del antibiótico directamente en el citoplasma de la bacteria.

La conjugación de un sideróforo y un antibiótico proporciona una optimización terapéutica al permitir la llegada del antibiótico a su diana aprovechando las propiedades como transportador del sideróforo. La unión de antibióticos como daptomicina, derivados de oxizolidinona o fluoroquinolonas con sideróforos ha permitido convertir esos fármacos en antibióticos de amplio espectro que muestran una actividad y unas características farmacocinéticas más amplias y mejoradas frente a las que mostraban los antibióticos originales.

La conjugación de sideróforos con otros fármacos puede llegar a ser muy eficaz en el tratamiento de enfermedades como la malaria o el cáncer ya que se caracterizan por una concentración elevada de hierro en ambos casos y los sideróforos presentan una gran afinidad por este metal, evitando también el desarrollo de infecciones y/o complicaciones. Además, el agente etiológico de la malaria produce sideromicinas que sirven como referencia para el desarrollo.

Por último, añadir que el uso de sideróforos en el diseño de fármacos y profármacos abre un nuevo campo de investigación en agentes antimicrobianos y antineoplásicos muy necesarios en el arsenal terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ribero M, Simões M. Advances in the antimicrobial and therapeutic potential of siderophores. *Environmental Chem. Letters*, 2019.
2. Prof. Biava M. *Drugs and their associations for treatment of nosocomial infections in the antibiotic resistance era* en “Hot Topics in Medicinal Chemistry” (Actualización en Química Farmacéutica). 2019, Oct 10, Universidad Complutense de Madrid, España.
3. Ballouche M, Cornelis P, Baysse, C. Iron Metabolism: A Promising Target for Antibacterial Strategies. *Recent Patents on Anti - Infective Drug Discovery*, 2009; 4, 190 - 205.
4. Liu R, Miller P.A, Vakulenko S.B, Stewart N.K, Bogges W.C, Miller M.J. A Synthetic Dual Drug Sideromycin Induces Gram - Negative Bacteria To Commit Suicide with Gram-Positive Antibiotic. *J. Med. Chem.* 2018; 3845 - 3854.
5. Negash K.H, Norris J.K.S, Hodgkinson J.T. Siderophore - Antibiotic Conjugate Design: New Drugs for Bad Bugs? *Molecules*, 2019; 24, 3314.
6. Proschak E, Stark H, Merk D. Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist’s Perspective on Multitargeting Compounds. *J. Med. Chem.* 2018; A - Y.
7. Lemos M.L. Asimilación de hierro mediante sideróforos en patógenos bacterianos de peces. En: *Sem@Foro* 2016; 61, 40-42.
8. Aguado - Santacruz, G.A, Moreno - Gómez B, Jiménez - Franciso B, García - Moya E, Preciado - Ortiz R.E. Impacto de los sideróforos microbios y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev. Fitotec. Mex.* 2012; Vol 25 (1): 9 - 21.
9. Braun V, Pramanuk A, Gwinner T, Köberle M, Bohn E. Sideromycins: tools and antibiotics. *BioMetals* 2009; 22: 3 - 13.
10. Patel K, Butala S, Khan T, Suvarna V, Sherje A, Dravyakar B. Mycobacterial siderophore: A review on chemistry and biology of siderophore and its potential as a target tuberculosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018; 156, 783 - 790.
11. Górska A, Sloderbach A, Marshall MP. Siderophore - drug complexes: potential medicinal applications of the ‘Trojan Horse’ strategy. *Trends Pharmacol Sci.* 2014; 35 (9) 442 - 449.
12. Ji C, Miller M.J. Siderophore - fluoroquinolone conjugates containing potential reduction- triggered linkers for drug release: synthesis and antibacterial activity. *BioMetals*, 2015; 28, 541 - 551.
13. Dux L.E, Milner S.J, Duhme - Klair A.K. Microbial iron scavengers. *EIC*, 2018. Disponible en: <http://eic.rsc.org/feature/microbial-iron-scavengers/2020191.article>
14. Schalk, I. J, Hannauer M, Braud A. *Environ. Microbiol.* 2011, 13 (11) 2844 - 2854.
15. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67: 593 - 656.

16. Henry C. Albomycin antibiotics discovered decades ago far to total synthesis. Chem & Eng News. 2018 Disponible en: <https://cen.acs.org/pharmaceuticals/antibiotics/Albomycin-antibiotics-discovered-decades-ago/fall/96/web/2018/09>
17. Zeng Y, Roy H, Patil P.B, Ibba M, Chen S. Characterization of Two Seryl-tRNA Synthetases in Albomycin - Producing *Streptomyces* sp. Strain ATCC 700974. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009; 53(11) 4619 – 4627.
18. Pramanik A, Braun V. Albomycin Uptake via a Ferric Hydroxamate Transport System of *Streptococcus pneumoniae* R6. Journal of bacteriology, 2006; 188 (11) 3878 – 3886.
19. Zhanel G.G, Golden A.R, Zelenitsky S, Wiebe K, Lawrence C.K, Adam H.J, Idowu T, Domalaon R, Schweizer F, Zhanel M.A, Lagacé-Wiens P.R.S, Walkty A.J, Noreddin A, Lynch Iii J.O, Karlowsky J.A. Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem - Resistant and Multidrug - Resistant Gram - Negative Bacilli. Drugs, 2019; 79 (3) 271 - 289.
20. Ghosh M, Lin Y, Miller P.A, Möllmann U, Bogges W.C, Miller M.J. Siderophore Conjugates of Daptomycin are Potent Inhibitors of Carbapenem Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. ACS Infect. Dis, 2018; A - G.
21. Kong H, Cheng W, Wei H, Yuan Y, Yang Z, Zhang X. An overview or recent progress in siderophore - antibiotic conjugates. European Journal of Medicinal Chemistry. 2019; 182 1-16.
22. Henry C. Conjugate sneaks antibiotic into Gram - negative bacteria. Chem & Eng News. 2018 Disponible en: <https://cen.acs.org/pharmaceuticals/antibiotics/Conjugate-sneaks-antibiotic-Gram-negative/96/i15>
23. Ghosh M, Miller MJ. Synthesis and In Vitro Antibacterial Activity of Spermidine-Based Mixed Catechol- and Hydroxamate-Containing Siderophore-Vancomycin Conjugates. Bioorganic & Med. Chemistry. 1996; 4 (1): 43 – 48.
24. Fuchs LY, Chichu L, Conde C, González VM, Noguez AH, Calderon E, Avonce N, Ovando C. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. Dpto. Biología Molecular. Mex 1994; 36: 428 – 438.
25. Ji C, Miller MJ. Chemical syntheses and in vitro antibacterial activity of two desferri-oxamine B - ciprofloxacin conjugates with potential esterase and phosphatase triggered drug release linkers. Bioorganic & Med Chemistry 2012; 20: 3828 – 3836.
26. Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. Trends in Molecular Medicine. 2016; 22 (12): 1077 – 1090.
27. Jung M, Mertens C, Bauer R, Rehwald C, Brüne B. Lipocalin - 2 and iron trafficking in the tumor microenvironment. Pharmacological Research. 2017; 120: 146 – 157.

28. Wu JY, Srinivas P, Pogue JM. Cefiderocol: A Novel Agent for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms. *Infect Dis Ther.* 2020 Mar; 9(1): 17–40.